

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

BLACK BORDERS

- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



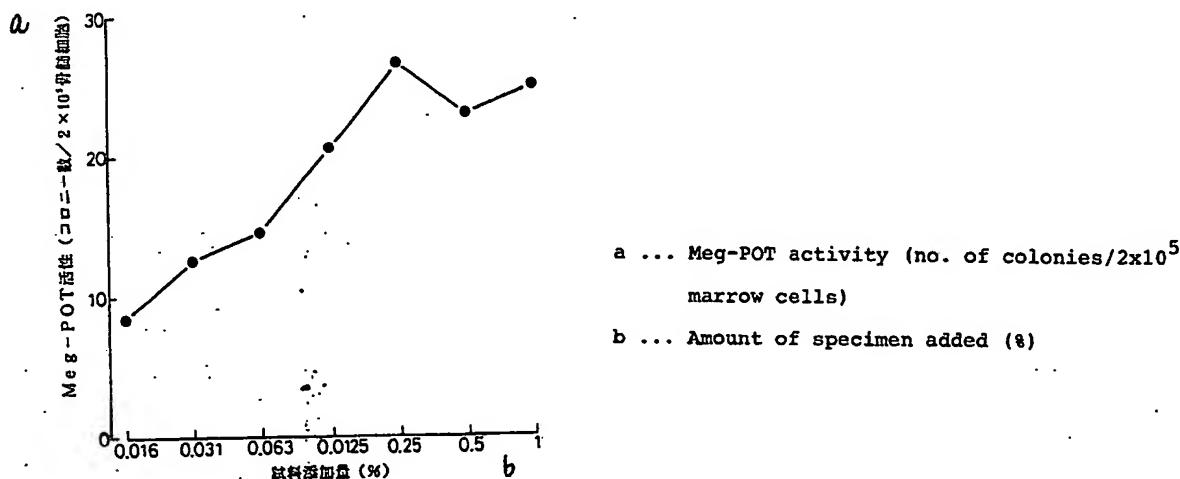
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類5 C07K 15/12 // A61K 37/02 C12P 21/02 (C12P 21/02 C12R 1:91)		A1	(11) 国際公開番号 (43) 国際公開日 1993年7月8日 (08.07.1993)	WO 93/13132
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日	PCT/JP92/01689 1992年12月24日 (24. 12. 92)		(81) 指定国 AT (欧洲特許), AU, BB, BE (欧洲特許), BF (OAPI特許), BG, BJ (OAPI特許), BR, OA, CF (OAPI特許), CG (OAPI特許), CH (欧洲特許), CI (OAPI特許), CM (OAPI特許), CS, DE (欧洲特許), DK (欧洲特許), ES (欧洲特許), FI, FR (欧洲特許), GA (OAPI特許), GB (欧洲特許), GN (OAPI特許), GR (欧洲特許), HU, IE (欧洲特許), IT (欧洲特許), KR, LK, LU (欧洲特許), MC (欧洲特許), MG, ML (OAPI特許), MN, MR (OAPI特許), MW, NL (欧洲特許), NO, NZ, PL, PT (欧洲特許), RO, RU, SD, SE (欧洲特許), SN (OAPI特許), TD (OAPI特許), TG (OAPI特許), UA US.	
(30) 優先権データ 特願平3/361522 特願平4/122518	1991年12月27日 (27. 12. 91) 1992年3月31日 (31. 03. 92)	JP		
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP] 〒115 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP)				
(72) 発明者: および (73) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 山口 希 (YAMAGUCHI, Nozomi) [JP/JP] 〒603 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル新御盛口町285-79 Kyoto, (JP)			添付公開書類	国際調査報告書
大枝匡義 (OH-EDA, Masayoshi) [JP/JP] 服部有宏 (HATTORI, Kunihiro) [JP/JP] 〒412 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP)				
(74) 代理人 弁理士 萩木 明, 外 (AOKI, Akira et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)				

(54) Title : NOVEL MEGAKARYOCYTE AMPLIFIER

(54) 発明の名称 新規な巨核球増幅因子



.(57) Abstract

A novel megakaryocyte amplifier (Meg-POT) derived from man, which has a molecular weight of about 32,000 according to SDS-PAGE and contains in its molecule the following amino acid sequence: Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val Leu. The Meg-POT is promising as a remedy for diseases caused by thrombocytopenia or platelet hypofunction.

(57) 要約

ヒト由来の新規な巨核球増幅因子(Meg-POT)が提供される。このMeg-POTはSDS-PAGEにおいて約32000の分子量を有する。また、分子中に下記アミノ酸配列を含む。

Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val Leu

このMeg-POTは血小板減少あるいは血小板機能低下等に起因する疾患の治療薬として期待される。

情報としての用途のみ
PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	MW	マラウイ
AU	オーストラリア	GA	ガボン	NL	オランダ
BB	バルバードス	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BE	ベルギー	GN	ギニア	NZ	ニュージーランド
BF	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	PT	ポルトガル
BJ	ベナン	IE	アイルランド	RO	ルーマニア
BR	ブラジル	IT	イタリー	RU	ロシア連邦
CA	カナダ	JP	日本	SD	スードン
CF	中央アフリカ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CG	コンゴー	KR	大韓民国	SK	スロヴァキア共和国
CH	スイス	KZ	カザフスタン	SN	セネガル
CI	コートジボアール	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソヴィエト連邦
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TD	チャード
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルグ	TG	トーゴ
CZ	チエコ共和国	MC	モナコ	UA	ウクライナ
DE	ドイツ	MG	マダガスカル	US	米国
DK	デンマーク	ML	マリ	VN	ベトナム
FL	フィンランド	MN	モンゴル		
ES	スペイン	MR	モーリタニア		

明細書

新規な巨核球増幅因子

技術分野

本発明は、多能性血液幹細胞より分化し巨核球コロニー形成細胞 (Megakaryocyte Colony-Forming Unit, 「CFU-Meg」)に作用し、インターロイキン3 (IL-3) 等の巨核球コロニー刺激因子 (Megakaryocyte Colony-Stimulating Factor: Meg-CSF と略記する) 活性を有する物質の存在下に巨核球の成熟を促進するヒト由来の巨核球増幅因子 (Megakaryocyte Potentiator 「以下 Meg-POT と略記することあり」) に関する。

背景技術

血小板は、生体の止血、血栓形成に重要な意義を持つ血液有形成分の一つである。血小板は、骨髓中の造血幹細胞から巨核球系前駆細胞を経て巨核芽球となり、さらに成熟した巨核球から血液中に放出される。

骨髓細胞から巨核球コロニーを形成させるには、2種類の異なる作用を持つ因子が必要であると考えられている (Williams, N et al. 「J. Cell Physiol.」 110, 101 (1982))。すなわち、単独で巨核球コロニーを形成する Meg-CSF および、それだけでは巨核球コロニーを形成させる活性はないが、Meg-CSF とともに加えると巨核球コロニー数を増加したり、その成熟を促進する作用を示す Meg-POT である。

ヒトでは Meg-CSF 活性を有するものとして IL-3 (Teramura, M et al. 「Exp. Hematol.」 16, 843 (1988)) や顆粒球・マクロファー

ジコロニー刺激因子(Teramura, M et al. 「Exp. Hematol.」 17, 1011 (1989)) 等が知られている。また、ヒトで Meg-POT 活性を有するものとしては、インターロイキン6 (Teramura, M and Mizoguchi, H 「Int. J. Cell Cloning」 8, 245 (1990))、インターロイキン11 (Teramura, M et al. 「Blood」 79, 327 (1992))、エリスロポエチン (Bruno, E et al. 「Blood」 73, 671 (1989)) 等が知られている。

しかし、これらのものは巨核球・血小板系に特異的な因子ではなく、むしろ他の血球系や血球系以外の細胞にも作用を有していることが知られている。従って、これらのものを医薬品として巨核球・血小板系への作用を期待して投与した場合、それとは別の作用をも発現してしまうことが危惧される。このようなことから、巨核球・血小板系に特異的に作用し、医薬品としての有用性の高い生理活性物質が望まれている。

発明の開示

従って本発明は、ヒト由来の単離された新規な巨核球増幅因子を提供するものである。

本発明者はヒト肺腺癌腫瘍細胞由来の株化細胞「HPC-Y5」(Nozomi Yamaguchi et.al CANCER RESEARCH 50, 7008 (1990) (1991年12月27日工業技術院微生物工業技術研究所に微工研条寄第3703号(FERM BP-3703) としてブダペスト条約に基づき国際寄託) を培養し、その培養上清より巨核球増幅因子(Meg-POT)を単離・精製することに成功し、その物性を解明し、本発明を完成した。即ち本発明は、つきの性質；

(1) *in vitro*において、IL-3 の存在下で用量依存的に巨核球コロニーを増殖させる；

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定で分子量

約32000に单一バンドを有する；

(3) 逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)（カラム：Vydac Protein C4, 4.6×250mm, 粒子サイズ5μm, Vydac社製）において0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)中アセトニトリル濃度40～45%の画分に溶出する；および

(4) 分子中に下記アミノ酸配列

Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val Leu
を有する巨核球増幅因子を提供する。

図面の簡単な説明

図1は実施例3におけるステップ-7の逆相HPLC(III)の結果を示す。

図2は実施例4におけるMeg-POTのSDS-PAGEによる分子量測定の結果を示す。

図3は実施例7における巨核球増幅因子のMeg-POT活性の濃度-反応曲線を示す。各点とも2回の測定の平均値である。なお、縦軸のMeg-POT活性は、被検検体添加時と非添加時(組換え型マウスIL-3単独)の巨核球コロニー数の差で示した。被検検体非添加時の巨核球コロニー数は22および25、平均23.5であった。

発明を実施するための最良の形態

製造方法

本発明の巨核球増幅因子は、例えばヒト腎臓癌腫瘍細胞由来の株化細胞「HPC-Y5」の培養上清から、次のようにして単離・精製することができる。先ず、株化細胞「HPC-Y5」を後出実施例2に詳細に示すとおり培養して培養上清を回収する。次いでこの培養上清より実施例3に詳細に示す手順により精製し単離する。

本発明の巨核球増幅因子は実施例に示す如くして単離・精製されたが、一旦単離・精製され、その性質が解明された後は、それらの性質を指標として蛋白質の単離・精製に用いられる任意の常法を用いて本発明の巨核球増幅因子を単離・精製することができるることは明らかである。

さらに、本発明の巨核球増幅因子を遺伝子工学的手段により製造することも可能である。例えば上記株化細胞「HPC-Y5」から常法に従ってmRNAを単離し、そのmRNAに基づき常法に従ってcDNAライブラリーを作製することができる。このcDNAライブラリーをスクリーニングするためのDNAプローブは、例えば本発明によって明らかにされた巨核球増幅因子の部分アミノ酸配列に基づいて設計することができる。あるいは本発明の巨核球増幅因子を酵素的にまたは化学的に切断し、その断片のアミノ酸配列を決定したのち、そのアミノ酸配列に基づいてDNAプローブを設計することもできる。

次に、こうして得られた巨核球増幅因子をコードするcDNAを適当なベクターに挿入したのち、この発現ベクターにより宿主を形質転換し、この形質転換体を培養することにより本発明の巨核球増幅因子を製造することができる。このための宿主としては、大腸菌のごとき原核細胞、酵母のごとき下等真核細胞、哺乳動物細胞のごとき高等真核細胞等、常用の宿主を用いることができる。

本発明の巨核球増幅因子の性質を以下に示す。

(1) 分子量

本発明の巨核球増幅因子は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定で分子量約32000(31000~33000)に单一バンドを有する。

(2) 部分アミノ酸配列

本発明の巨核球増幅因子、あるいは本因子をプロテアーゼで消化

した後、逆相HPLCにより得られたペプチド断片を気相式プロテインシーケンサー470A型(ABI社製)を用いてエドマン(Edman)分解し、得られたPTH-アミノ酸をPTH-アナライザー120型(ABI社製)にて同定した場合、分子中に次のアミノ酸配列(配列番号:1);
Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val Leuを有する。この配列はPIR蛋白質データベースおよびSwiss Prot蛋白質データベースで検索した結果、同一の配列は見いだされなかった。

(3) 巨核球増幅因子活性

本発明の巨核球増幅因子は、逆相クロマトグラフィー(カラム: Vydac Protein C4, 4.6×250mm, 粒子サイズ5μm, Vydac社製)において0.1%TFA中アセトニトリル濃度40~45%の画分に巨核球増幅因子活性が認められる。

なお、巨核球増幅因子活性は次記の方法で測定した。

巨核球増幅因子活性の測定方法

マウス骨髄細胞を用い、単層軟寒天培養法により行う。

即ち、ウマ血清(56℃30分処理、Biocell社製)0.2ml、マウス(C57BL/6N系雄性、6~12週齢)大腿骨骨髄細胞0.1ml(2×10^5 有核細胞)、組換え型マウスIL-3を5ng/mlを含むIscove's Modified Dulbecco's 培養液(IMDM)0.2ml、寒天を0.75%含む改変McCoy's 5A培養液0.4mlおよび被検検体(10%ウマ血清を含むIMDMで希釈したもの)0.1mlを混合して、直径35mmの組織培養プラスティックディッシュに入れて固まらせたのち、37℃、5%炭酸ガス/95%空気、100%湿度の条件で培養を行う。培養6日目に寒天層ごとスライドガラス上に取り出し乾燥させ、フィルム状標本としたものを5%グルタルアルデヒドで固定し、Nakeffらの方法(Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 151, 587(1976年))により、アセチルコリンエステラーゼ染色および巨核球コロニー数の算定を行う。この際、アセチルコ

リンエステラーゼ染色陽性細胞を4個以上含む集塊を巨核球コロニーとする。顕鏡の倍率は200倍である。なお、Meg-POT活性は、被検検体を添加して生じた巨核球コロニー数と被検検体を添加せずに(10%ウマ血清を含むIMDMのみ溶媒として添加)組換え型IL-3単独で生じた巨核球コロニー数との差を指標とする。

なお、本発明の巨核球増幅因子は糖蛋白質であるが、常法で得られる脱糖鎖体も巨核球増幅因子活性を有することが考えられることから、本発明に含まれることは明確である。

以下に実施例によって本発明を詳細に説明するが、この実施例によって本発明が限定されるものではない。

実施例1. Meg-POT産生細胞株 HPC-Y5の樹立

脇腋癌患者のリンパ節より得られた腫瘍を10%ウシ胎児血清(FBS)を含むRPMI1640培地を用い、炭酸ガスインキュベーター(炭酸ガス濃度5%、温度100%)中にて培養することにより樹立した。この細胞株を1%FBS含有Ham's F10培地に順化させ、さらにFBS濃度を徐々に低下させ、最終的に蛋白不含のHam's F10培地中にても増殖し得るまで順化させた。本細胞株はプラスティックディッシュ上で単層状に増殖し、倍化時間は約33時間であった。(Nozomi Yamaguchi et.al 「CANCER RESEARCH」50, 7008 (1990) 参照)

実施例2. HPC-Y5の継代培養およびローラーボトルによる大量培養

実施例1で述べたHPC-Y5細胞の継代培養は以下に示す如く行った。プラスティック培養フラスコ(150cm²、コーニング社製)を用い、10⁻⁸M亜セレン酸ナトリウム、100U/mlペニシリングカリウムおよび100μg/ml硫酸カナマイシンを含むHam's Nutrient Mixture F12培養液50ml中でHPC-Y5細胞を培養し、4日毎に培養液を交換した。

細胞継代時に培養液を除去し、あらかじめ37℃に加温した 0.125 %トリプシン(GIBCO社製)、0.01%EDTA(和光純薬社製)を含むCa, Mg不含 Dulbecco's PBS溶液を加え37℃で5分間加温した。ピペットイング操作により細胞を剥離し、15ml容量のプラスティック製遠心管に細胞を移し、1500回転／分、5分間の遠心により細胞を回収した。細胞を上記培養液に懸濁し、新しいフラスコ4～5本に継代した。一晩静置後、培養液を非付着性細胞と共に除去し、新たに上記培養液を加えて培養を継続した。以後4日毎に培養液を交換した。

また、実施例3で述べる Meg-POTの精製に供するための HPC-Y5細胞のローラーボトルによる大量培養を以下の如く実施した。

上記の如く継代された HPC-Y5細胞が完全に密に増殖した150cm²のプラスティック培養フラスコより上記の如くトリプシン-EDTAを用いて細胞を回収し、これを 0.2%ウシ胎児血清(Hyclone社製)を含有する上記培養液 250mlに浮遊させ、1700cm²のプラスティック製ローラーボトル(コーニング社製)に移し、0.5回転／分の速度で回転培養を行った。7日後に培養液を血清を含まない上記培養液に交換し、以後4日毎に上記無血清培養液の交換を行うことにより、精製用無血清培養上清を回収した。

実施例3. HPC-Y5株培養上清からの Meg-POT の精製

実施例2で述べた方法に従って得た HPC-Y5細胞の培養上清(27.3リットル)にTween 20を終濃度0.01%となるように加えた後、人工腎臓PAN 1200(旭メディカ社製)を用いて、約200倍に濃縮した。濃縮液を0.01%Tween 20を含む10mM酢酸緩衝液(pH5.0)に対し、4℃で一晩透析した。透析内液に遠心操作(10000×g, 60分)を施し不溶物を除去し上清を以下の精製に用いた。

(ステップ-1) S-Sephadex イオン交換クロマトグラフィー

上述の遠心上清を0.01%Tween 20を含む20mM酢酸緩衝液(pH5.0)

で平衡化したS-Sepharose Fast Flow(ファルマシア社製)カラム($5 \times 10\text{cm}$)に添加した。同緩衝液でカラムを洗浄した後、同緩衝液中、NaClの濃度を0.15M、0.3M及び1.0Mと順次上げて吸着蛋白を溶出した。素通り画分、洗浄画分および各塩濃度における溶出画分について先に述べた方法に従って活性を測定した結果、0.15M-NaCl溶出画分にMeg-POT活性が認められた。

(ステップ-2) DEAE-Sepharose イオン交換クロマトグラフィ

二

ステップ-1で得た活性画分を0.01%Tween 20を含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)に対し4°Cで一晩透析した。透析内液を同緩衝液で平衡化したDEAE-Sepharose Fast Flow(ファルマシア社製)カラム($2.2 \times 13\text{cm}$)に添加し、同緩衝液でカラムを洗浄した。同緩衝液中NaClの濃度を0.15M、0.3Mおよび1.0Mと順次上げて吸着蛋白を溶出した。素通り画分、洗浄画分および各塩濃度における溶出画分について先に述べた方法に従って活性を測定した結果、0.15M-NaCl溶出画分にMeg-POT活性が認められた。

(ステップ-3) 逆相HPLC(I)

ステップ-2で得た活性画分に5%トリフルオロ酢酸(TFA)を加えてpHを約2に調整し、0.1%TFAを含む5%アセトニトリルで平衡化した逆相HPLCカラム(Vydac Protein C4, $10 \times 250\text{mm}$, 粒子サイズ $5 \mu\text{m}$, Vydac社製)に流速1.0ml/分で添加した。吸着蛋白はアセトニトリルの直線濃度勾配(5%→65%, 120分、0.5%アセトニトリル/分)により流速1ml/分で溶出した。溶出蛋白の検出は220nmおよび280nmにおける吸光度を追跡することにより行い、1mlずつ分画した。各画分について活性測定を行った結果、アセトニトリル濃度40-45%の画分にMeg-POT活性が認められた。

(ステップ-4) 逆相HPLC (II)

ステップ-3で得た活性画分を 0.1% TFAで2倍希釈し、 0.1% TFAを含む35%アセトニトリルで平衡化した逆相HPLCカラム(Vydac Protein C4, 4.6×250mm, 粒子サイズ5 μm, Vydac社製)に流速1.0ml/分で添加した。吸着蛋白はアセトニトリルの直線濃度勾配(35%→50%, 75分、 0.2%アセトニトリル/分)により流速1ml/分で溶出した。溶出蛋白の検出は 220nmおよび 280nmにおける吸光度を追跡することにより行い、 1mlずつ分画した。各画分について活性測定を行った結果、アセトニトリル濃度40-45%の画分に Meg-POT 活性が認められた。

(ステップ-5) DEAE・イオン交換HPLC

ステップ-4で得た活性画分を凍結乾燥した後、 0.01%Tween 20を含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解し、 同緩衝液で平衡化したProtein Pak G-DEAEカラム(Waters社製、 8.2×75mm)に流速 0.7ml/分で添加した。吸着蛋白はNaClの直線濃度勾配(0.0M → 0.2M, 40分、 5 mM NaCl/分)により流速 0.7ml/分で溶出した。溶出蛋白は 220nmで検出し、 0.7mlずつ分画した。各画分について活性を測定した結果、 NaCl濃度75mM以下の画分に Meg-POT 活性が認められた。

(ステップ-6) TSKgel G3000SWゲルfiltration

ステップ-5で得た活性画分を、 0.01%Tween 20及び0.15M NaClを含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したTSKgel G3000SWカラム(東ソー社製 21.5×600nm, ガードカラム21.5×75nm)に流速3ml/分で流出させ、 そして溶出蛋白は 220nmで検出した。3mlずつ分画した各画分について、 活性測定した結果、 Meg-POT 活性は溶出時間49~54分の画分に認められたので、 その画分を回収した。

(ステップー7) 逆相HPLC (III)

ステップー6で得た活性画分を5% TFAを加えてpHを約2に調整し、ステップー4の逆相HPLC (II) と同一条件下にクロマトグラフィーを行った。各画分について活性を測定した結果、主ピーク(アセトニトリル濃度40%~45%)にMeg-POT活性が認められた。この結果を図-1に示す。図-1において横棒で示すピーク画分を精製Meg-POTとして回収した。

実施例4. 巨核球増幅因子(Meg-POT)の分子量

実施例3で精製した巨核球増幅因子の分子量をドデシル硫酸ナトリウム-ボリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により測定した。分離ゲル濃度は12%、濃縮ゲル濃度は4%とした。これらの試料を遠心濃縮器(トミー精工社製)を用いて乾燥し、5%2-メルカプトエタノールおよび2%SDSを含む試料用緩衝液(pH6.8)に溶解し、3分間煮沸した。泳動は100Vで30分、140Vで1時間行い、ゲルはメタノール：酢酸：水=3:1:6で固定し、銀染色試薬(第一化学薬品社製)により蛋白質を染色した。

分子量マーカーはバイオラッド社製低分子量マーカー[Phosphorylase b (92.5kd), Bovine serum albumin (66.2kd), Ovalbumin (45.0kd), Carbonic anhydrase (31.0kd), Soybean trypsin inhibitor (21.5kd), Lysozyme (14.4kd)]を用いた。

この結果を図2に示す。図2から明らかなとおり、本発明の巨核球増幅因子(Meg-POT)は分子量約32000(31000~33000)に単一バンドを示した。

実施例5. 巨核球増幅因子(Meg-POT)のアミノ酸組成

実施例3で得た精製Meg-POT試料を1%フェノールを含む6N HClで、110°C、24時間、減圧下加水分解した。遊離したアミノ酸にフェニルイソチオシアネートを加え、室温で25分間反応させ、フ

エニルチオカルバモイル(PTC)誘導体とした。得られた PTC誘導体をPico-Tag アミノ酸自動分析システム（ウォーターズ社製）を用いて定量した。定量結果及び Alaを24個あるいは Glxを29個とした時のアミノ酸組成を表1に示す。

表 1

	pmole	Ala = 24	Glx = 29
Asx (D, N)	542.4	18.2	18.0
Glx (E, Q)	875.2	29.3	29.0
Ser (S)	521.1	17.4	17.3
Gly (G)	569.9	19.1	18.9
His (H)	38.1	1.3	1.3
Arg (R)	602.5	20.2	20.0
Thr (T)	223.2	7.5	7.4
Ala (A)	717.3	24.0	23.8
Pro (P)	589.4	19.7	19.5
Tyr (Y)	34.5	1.2	1.1
Val (V)	329.4	11.0	10.9
Met (M)	35.1	1.2	1.2
Cys (C)	N.D. *	—	—
Ile (I)	100.5	3.4	3.3
Leu (L)	957.9	32.1	31.7
Phe (F)	172.6	5.8	5.7
Trp (W)	N.D. *	—	—
Lys (K)	89.6	3.0	3.0

* N.D. 定量せず

実施例6. 巨核球増幅因子(Meg-POT)のアミノ酸配列

実施例3で得た精製 Meg-POT 試料を気相式プロテインシーカー

ンサー470A型（アプライドバイオシステムズ・インク社製）を用いてエドマン分解を行い、得られた PTH-アミノ酸を PTHアナライザー 120型（アプライドバイオシステムズ・インク社製）を用いて同定した。その結果、N末端近傍のアミノ酸配列（配列-1～3）は以下に示す3種が認められた。また、実施例3で得た精製 Meg-POT試料を V 8 プロテアーゼで消化し、逆相HPLCで単離したペプチド断片を用い、同様の処理操作によって同定されたアミノ酸配列を配列4として示す。なお Xaaは未同定のアミノ酸残基を示す。

配列-1 Leu Ala Gly Glu Xaa Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val

配列-2 1 5 10
Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val

配列-3 1 5 10
Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val

配列-4 1 5
Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val

配列-1 Leu (配列番号: 5)

配列-2 15 Leu Ala (配列番号: 4)

配列-3 Leu¹⁵ Ala Asn (配列番号: 3)

10 15 20
配列-4 Leu Ala Asn Pro Pro Xaa Ile Ser Ser Leu Xaa Pro Arg Gln Leu

Leu Gly Phe Pro (配列番号: 2)

(配列の上に示す数字はエドマン分解時のサイクル数である)

上記の配列1～3のアミノ酸配列において以下のアミノ酸配列が共通していることが認められた。

Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val Leu

(配列番号: 1)

実施例7. 巨核球増幅因子(Meg-POT)の巨核球増幅因子活性

実施例3で精製した巨核球増幅因子のマウス骨髄細胞に対する巨核球増幅因子活性を先に述べた方法に従って測定した。即ち、精製 Meg-POT を10%ウマ血清を含むIMDMで10倍希釈した。これをさらにウマ血清を含む上記IMDMで2, 4, 8, 16, 32および64倍に希釈したものを作製し、これらを被検検体として活性の測定を行った結果、図3に示すような濃度-反応曲線が得られた。

産業上の利用可能性

本発明の巨核球増幅因子は、IL-3の存在下、用量依存的に巨核球コロニーを増殖させる作用を有することから、例えば血小板減少あるいは血小板の機能低下を伴う疾患に対する治療剤としての有用性が期待される。

規則第13規則の2の寄託された微生物への言及

寄託機関：通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号

寄託番号及び寄託した日付：

1. 微工研条寄第3703号 1991年12月27日

配列表

配列番号：1

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly	Glu	Thr	Gly	Gln	Glu	Ala	Ala	Pro	Leu	Asp	Gly	Val	Leu
1				5						10			

配列番号：2

配列の長さ：26

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：ペプチド

配列

Ala	Ala	Pro	Leu	Asp	Gly	Val	Leu	Ala	Asn	Pro	Pro	Xaa	Ile	Ser
1				5					10				15	
Ser	Leu	Xaa	Pro	Arg	Gln	Leu	Leu	Gly	Phe	Pro				
				20					25					

配列番号：3

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly	Glu	Thr	Gly	Gln	Glu	Ala	Ala	Pro	Leu	Asp	Gly	Val	Leu	Ala
1					5					10				15
Asn														

配列番号： 4

配列の長さ： 16

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直線状

配列の種類： ペプチド

配列

Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val Leu
1 5 10 15

Ala

配列番号： 5

配列の長さ： 16

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直線状

配列の種類： ペプチド

配列

Leu Ala Gly Glu Xaa Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val
1 5 10 15

Leu

請 求 の 範 囲

1. 次の性質；

(1) *in vitro*において、IL-3 の存在下で巨核球コロニーを用量依存的に増殖させる；

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定で分子量約32000 に単一バンドを有する；

(3) 逆相高速液体クロマトグラフィー（カラム：Vydac Protein C4, 4.6×250mm, 粒子サイズ 5 μm, Vydac 社製）において 0.1% トリフルオロ酢酸中アセトニトリル濃度40～45%の画分に溶出する；
および

(4) 分子中に下記アミノ酸配列
GIy Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val Leu
を有する巨核球增幅因子。

Fig.1

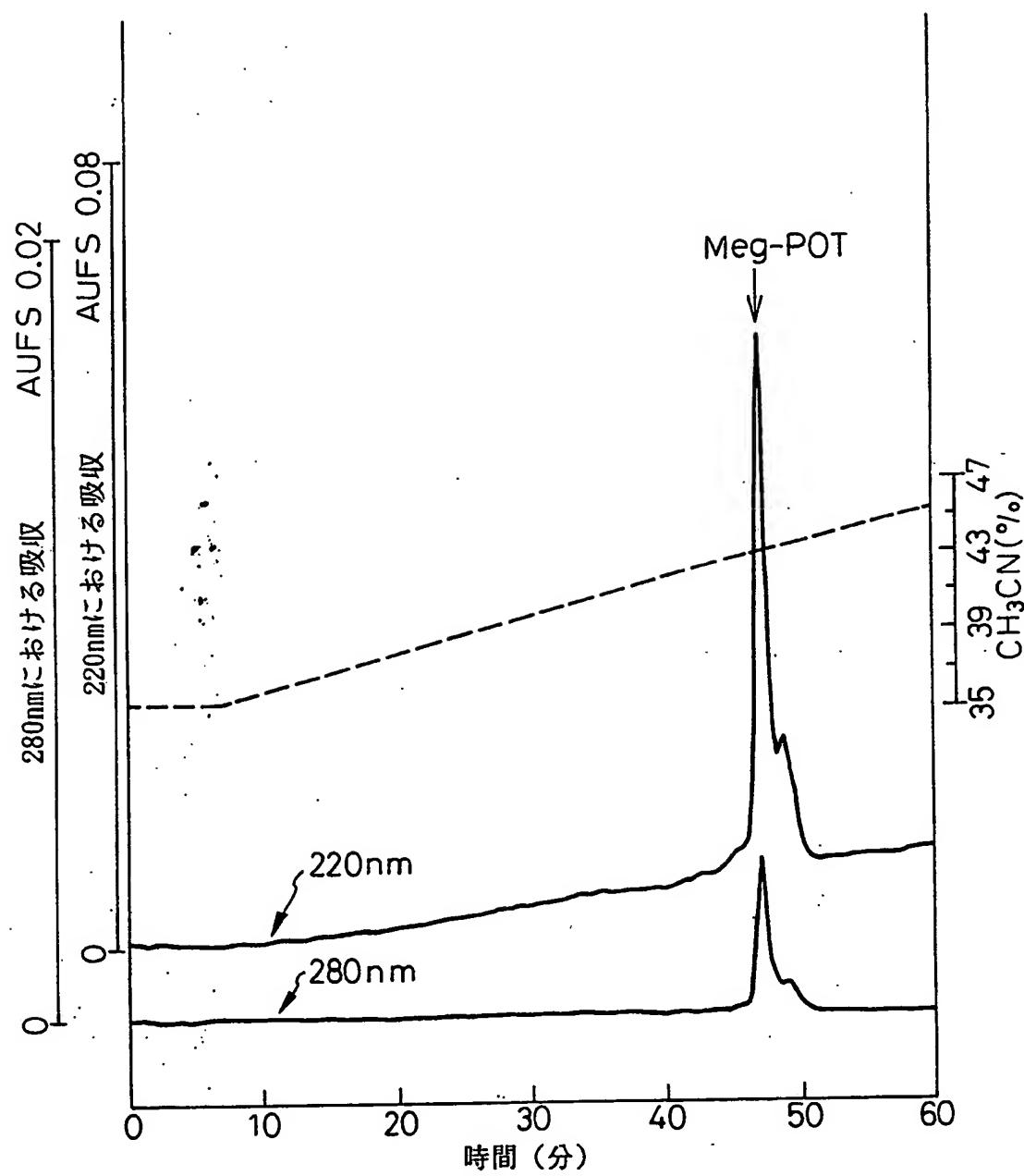
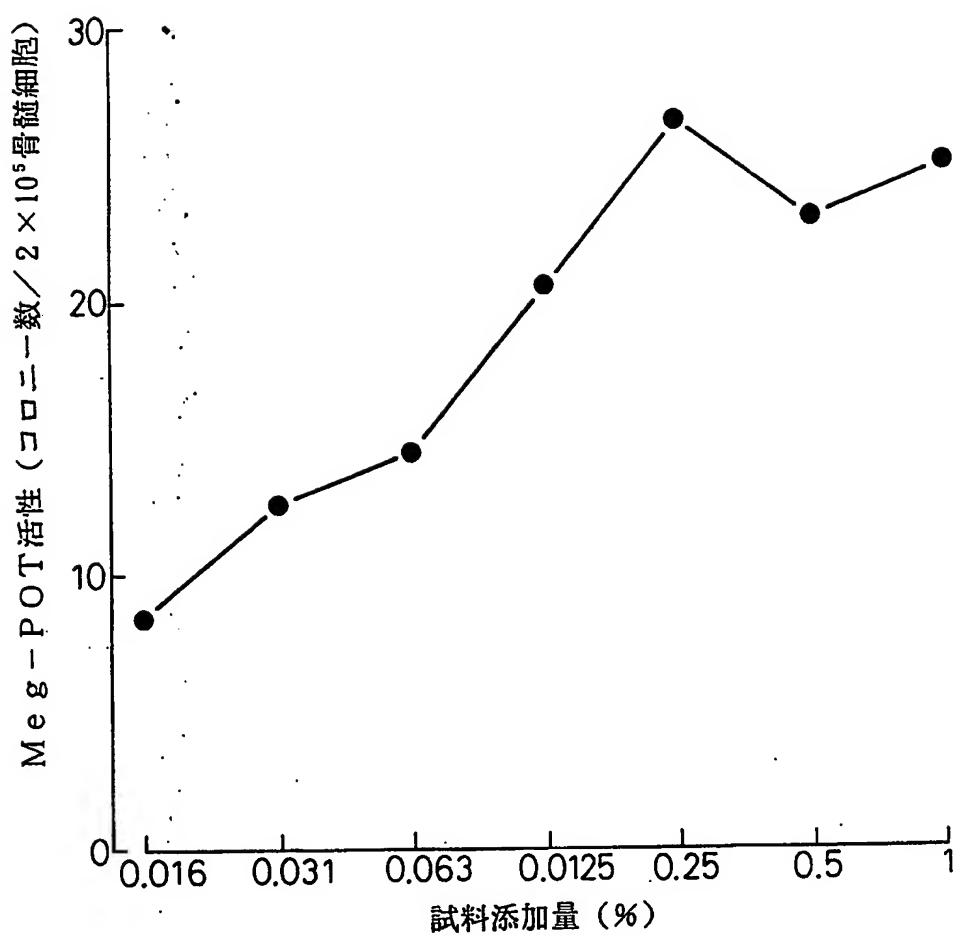


Fig.2

- 92.5 ^{kd} PHOSPHORYLASE b
- 66.2 BOVINE SERUM ALBUMIN
- 45.0 OVALBUMIN
- 31.0 CARBONIC ANHYDRASE
- 21.5 SOYBEAN TRYPSIN INHIBITOR
- 14.4 LYSOZYME

Fig.3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP92/01689

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ C07K15/12//A61K37/02, C12P21/02 (C12P21/02, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ C07K15/04, 15/12, C12P21/00, 21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	JP, A, 4-295500 (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), October 20, 1992 (20. 10. 92), & WO, A1, 92/17500 & AU, A, 9214350	1
A	Blood Cells, Vol. 15, No. 1, (1989), M. W. Long "Signal transduction events in vitro megakaryocytopoiesis" p. 205-229	1

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

March 29, 1993 (29. 03. 93)

Date of mailing of the international search report

April 20, 1993 (20. 04. 93)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. CL^{*} C07K15/12 / A61K87/02, C12P21/02
(C12P21/02, C12R1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. CL^{*} C07K15/04, 15/12, C12P21/00, 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	JP, A, 4-295500 (旭化成工業株式会社), 20. 10月. 1992 (20. 10. 92) &WO, A1, 92/17500&AU, A, 9214350	1
A	Blood Cells, 第15巻, 第1号, (1989), M. W. Long "Signal transduction events in vitro megakaryocytopoiesis" p. 205-229	1

C欄の続きにも文献が例挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 03. 93

国際調査報告の発送日

20.04.93

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

内田俊生

4 B 8 2 1 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3449